



تأثیر سلول‌های بنیادی خون بند ناف بر بازسازی بافت کبد در مدل‌های آسیب کبدی سگ

بهناز بگشلوی افشار^{۱*}

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، استان گلستان، ایران.

* نویسنده مسئول. ایمیل: behnaz97@gmail.com

چکیده

کبد یکی از ارگان‌های اصلی بدن است که با وجود دارا بودن توان بالای بازسازی، در صورت بروز آسیب‌های حاد یا مزمن ممکن است نتواند به‌طور کامل عملکرد طبیعی خود را بازیابد و در نهایت دچار نارسایی شود. در سال‌های اخیر، استفاده از سلول‌های بنیادی به‌عنوان روشی نوین برای ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. در این مطالعه، اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از خون بند ناف سگ (cUCB-MSCs) بر بازسازی بافت کبد در مدل‌های تجربی آسیب کبدی بررسی شد. مدل آسیب با القای سمی تتراکلریدکربن (CCl₄) به‌صورت دوز کنترل‌شده ایجاد گردید. سلول‌های بنیادی پس از جداسازی، پالایش و تعیین شاخص‌های فنوتیپی (CD90⁺ و CD105⁺ مثبت، CD34⁻ و CD45⁻ منفی) به‌صورت وریدی به حیوانات تزریق شدند. پارامترهای ارزیابی شامل سنجش‌های بیوشیمیایی سرم (ALT، AST، ALP، آلبومین، بیلی‌روبین)، بیان ژن‌های اختصاصی کبد (آلبومین، HNF4α، CYP3A12) و بررسی‌های بافت‌شناسی (رنگ‌آمیزی H&E، درجه فیبروز، ارزیابی ساختار هسته و نسبت حجمی کبد) بود. نتایج نشان داد در گروه درمانی، مقادیر ALT و AST کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$) و نسبت آلبومین به بیلی‌روبین به‌طور محسوسی بهبود یافت. همچنین، بیان ژن‌های آلبومین و HNF4α به‌ترتیب حدود ۲.۵ و ۲ برابر در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داد. بررسی‌های بافتی کاهش واضح نواحی نکروز و التهاب را همراه با کاهش شدت فیبروز (میانگین امتیاز ۱.۸ در برابر ۳.۲ در گروه کنترل) آشکار ساخت. این یافته‌ها بیانگر آن است که سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف سگ توان بالقوه‌ی بالایی برای بازسازی و بازگردانی عملکرد طبیعی بافت کبد در مدل‌های آسیب‌دیده دارند. بر این اساس، می‌توان از این سلول‌ها به‌عنوان گزینه‌ای مؤثر و مکمل در درمان اختلالات شدید کبدی در سگ‌ها بهره برد. باین‌حال، انجام مطالعات گسترده‌تر جهت تعیین دوز بهینه، مسیر تزریق مناسب و ارزیابی ایمنی بلندمدت توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی خون بند ناف، بازسازی بافت کبد، مدل حیوانی سگ، سلول‌های مزانشیمی، آسیب کبدی.

Effect of Umbilical Cord Blood-Derived Stem Cells on Liver Tissue Regeneration in Canine Liver Injury Models

Behnaz Bageshlooyafshar^{1,*}

1- Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Gonbad-e Kavous, Golestan, Iran. Email: behnaz97@gmail.com

* Corresponding Author

Abstract

The liver is a vital organ with an inherent regenerative capacity; however, in conditions of acute or chronic injury, this intrinsic ability may be insufficient, leading to hepatic dysfunction or failure. Recently, stem cell-based therapeutic strategies have gained growing attention as innovative approaches for the repair of damaged tissues. In the present study, we investigated the regenerative effects of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (cUCB-MSCs) on hepatic tissue recovery in experimentally induced liver injury models. Hepatic damage was established by controlled administration of carbon tetrachloride (CCl₄). The isolated cUCB-MSCs were purified, phenotypically characterized (CD90⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻), and subsequently infused intravenously into the test animals. Evaluation parameters included serum biochemistry (ALT, AST, ALP, albumin, bilirubin), hepatic gene expression (albumin, HNF4α, CYP3A12), and histopathological analysis (H&E staining, fibrosis grading, nuclear size, and liver-to-body ratio). The results demonstrated that ALT and AST levels significantly declined ($p < 0.05$) in the treatment group, with a concurrent improvement in the albumin-to-bilirubin ratio. Gene expression analyses revealed approximately 2.5-fold and 2-fold increases in albumin and HNF4α expression, respectively, compared with the control group. Histologically, necrotic and inflammatory areas were notably reduced, and fibrosis severity decreased (mean fibrosis score: 1.8 vs. 3.2 in controls). These findings suggest that cUCB-MSCs possess a strong regenerative potential to restore hepatic architecture and function in canine liver injury models. Consequently, this stem cell-based therapy could serve as a promising adjunctive option for the treatment of severe liver damage in dogs. Further studies are warranted to optimize dosage, delivery routes, and evaluate long-term safety outcomes.

Keywords: Umbilical cord blood stem cells, liver regeneration, canine model, mesenchymal stem cells, hepatic injury.

مقدمه

کبد از مهم‌ترین اندام‌های حیاتی بدن به شمار می‌رود و در انجام فرایندهای کلیدی متابولیکی، دفع مواد سمی، و سنتز پروتئین‌های حیاتی نقش اساسی دارد. با وجود توانایی طبیعی این اندام در بازسازی، در شرایطی مانند نارسایی حاد یا مزمن، یا آسیب ناشی از داروها، ترکیبات سمی و عوامل ویروسی، ظرفیت ذاتی بازسازی آن کاهش می‌یابد و به مرگ گسترده سلول‌های کبدی و اختلال در عملکرد فیزیولوژیک منجر می‌شود [۱،۲]. هرچند پیوند کبد به‌عنوان تنها روش درمان قطعی برای بیماران مبتلا به نارسایی شدید مطرح است، اما چالش‌هایی مانند کمبود اهداکنندگان، عوارض پس از پیوند و هزینه‌ی بالا، توجه پژوهشگران را به سوی درمان‌های جایگزین معطوف کرده است [۳].

در سال‌های اخیر، درمان‌های بازسازی مبتنی بر سلول‌های بنیادی به‌عنوان رویکردی نوین و امیدبخش در بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده معرفی شده‌اند [۴]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells; MSCs) به‌ویژه به‌دلیل ویژگی‌های چندظرفیتی خود در تمایز به رده‌های سلولی مختلف، از جمله سلول‌های شبه‌هپاتوسیتی، و نیز ترشح فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌های ضدالتهابی، جایگاه ویژه‌ای در پژوهش‌های بازسازی پیدا کرده‌اند [۵،۶]. این سلول‌ها از منابع گوناگونی از جمله مغز استخوان، بافت چربی، جفت و خون بند ناف قابل استخراجند [۷]. در میان این منابع، خون بند ناف به سبب جمع‌آوری آسان، غیرتهاجمی بودن فرایند جداسازی و احتمال اندک بروز واکنش‌های ایمنی، به‌عنوان گزینه‌ای برتر برای به‌دست‌آوردن سلول‌های بنیادی مطرح شده است [۸].

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف سگ (canine Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells) قادر به تمایز به سلول‌های شبه‌کبدی در شرایط کشت آزمایشگاهی هستند [۹،۱۰]. افزون بر این، پژوهش‌های درون‌تنی (in vivo) بر مدل‌های حیوانی مختلف نشان می‌دهد که این سلول‌ها از طریق ترشح فاکتورهای رشد پاراکرینی همچون HGF (Hepatocyte Growth Factor)، TGF- β و VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)، فرایند بازسازی بافت کبد را تسریع می‌کنند [۱۱]. همچنین، سلول‌های cUCB-MSCs با تعدیل پاسخ‌های ایمنی و مهار مسیرهای التهابی، در کاهش فیبروز و بازگردانی ساختار طبیعی بافت کبدی مؤثر گزارش شده‌اند [۱۲].

از دیدگاه سلولی و مولکولی، بازسازی کبد از طریق فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ مهمی همچون Wnt/ β -catenin، STAT3 و Notch تنظیم می‌شود [۱۳]. سلول‌های بنیادی می‌توانند با تحریک این مسیرها، تکثیر سلول‌های بومی کبد (از جمله هپاتوسیت‌ها و سلول‌های کوپفر) را تقویت کرده و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی (apoptosis) را کاهش دهند [۱۴]. در مطالعاتی که بر مدل‌های حیوانی کوچک مانند موش و رت انجام شده، تزریق سلول‌های MSC حاصل از خون بند ناف منجر به کاهش معنی‌دار آنزیم‌های ALT و AST، افزایش سطح آلبومین و بهبود قابل‌توجه ساختار بافتی کبد شده است [۱۵،۱۶]. با این حال، داده‌های موجود در مورد کاربرد این سلول‌ها در مدل‌های حیوانی بزرگ‌تر از جمله سگ‌ها همچنان محدود است [۱۷].

سگ‌ها به دلیل شباهت زیاد در ساختار و عملکرد کبد با انسان، یکی از مدل‌های مناسب برای بررسی بازسازی کبدی محسوب می‌شوند [۱۸]. در مطالعات دامپزشکی اخیر، تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مدل‌های آسیب کبدی ناشی از تتراکلریدکربن (CCl₄) یا استامینوفن موجب بهبود ساختار بافتی، کاهش نکرز و بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی شده است

[۱۹،۲۰]. با وجود این، بررسی اختصاصی نقش سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف در بازسازی کبدی در سگ هنوز به‌طور نظام‌مند انجام نشده است.

اهمیت مطالعه‌ی حاضر در آن است که استفاده از سلول‌های cUCB-MSCs می‌تواند جایگزینی ایمن‌تر و کارآمدتر نسبت به منابع سلولی متداول نظیر مغز استخوان و بافت چربی باشد. علاوه بر این، استخراج سلول‌های بنیادی از خون بند ناف بدون نیاز به جراحی انجام می‌شود و احتمال بروز پاسخ‌های ایمنی به‌دلیل سطح پایین بیان آنتی‌ژن‌های MHC بسیار اندک است [۲۱]. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف سگ بر بازسازی بافت کبد در مدل‌های تجربی آسیب کبدی طراحی گردیده است. این تحقیق با تمرکز بر شاخص‌های بیوشیمیایی، ژنتیکی و هیستولوژیکی می‌تواند گامی مؤثر در جهت توسعه‌ی درمان‌های بازسازی دامپزشکی و زمینه‌سازی برای کاربردهای بالینی در انسان باشد [۲۲].

بیان مساله

با وجود پیشرفت‌های گسترده در زمینه پیوند کبد و درمان‌های دارویی، نارسایی حاد و مزمن کبد همچنان یکی از مشکلات اساسی در حوزه‌های پزشکی و دامپزشکی به شمار می‌رود. آمارهای جهانی نشان می‌دهد که میزان مرگ‌ومیر ناشی از نارسایی کبدی در انسان و حیوانات همچنان بالا باقی مانده است و محدودیت منابع اهداکننده، بروز عفونت‌های ثانویه و احتمال رد پیوند، اثربخشی روش‌های درمانی رایج را با چالش روبه‌رو کرده است [۲۳،۲۴]. در چنین شرایطی، درمان‌های مبتنی بر سلول‌های بنیادی به‌عنوان یک رویکرد بازسازی نوین، افق تازه‌ای برای بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده کبد گشوده‌اند. پرسش کلیدی در این میان آن است که کدام منبع سلولی می‌تواند بیشترین ایمنی، اثربخشی و پایداری عملکردی را در محیط فیزیولوژیک کبد فراهم آورد؟

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) حاصل از بافت‌هایی مانند مغز استخوان، بافت چربی و جفت در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند، با این حال برداشت آن‌ها اغلب مستلزم روش‌های تهاجمی است و عواملی مانند افزایش سن، کاهش توان تکثیر و خطر آلودگی میکروبی، کارایی آن‌ها را محدود می‌کند [۶،۷]. در مقابل، سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف (UCB-MSCs) به دلیل سهولت دسترسی، ماهیت غیرتهاجمی فرایند جداسازی، ویژگی‌های ایمونولوژیکی مطلوب و ظرفیت بالای تکثیر، گزینه‌ای مناسب‌تر برای کاربردهای درمانی بازسازی به‌شمار می‌روند [۸،۹]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این سلول‌ها در مدل‌های حیوانی کوچک مانند موش و رت قادرند از طریق فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی Wnt/ β -catenin، PI3K/Akt/STAT3، بازسازی عملکردی بافت کبد را تسریع نمایند [۱۲،۱۱]. با وجود این، داده‌های علمی موجود درباره‌ی استفاده از سلول‌های بنیادی خون بند ناف در گونه‌های حیوانی بزرگ‌تر، از جمله سگ‌ها، هنوز محدود است. اغلب پژوهش‌های پیشین بر روی جوندگان انجام شده و به همین دلیل اطلاعات جامعی از نظر فارماکودینامیک، ایمنی، ماندگاری اثر درمانی و بیان ژن‌های اختصاصی کبد در مدل سگ در دسترس نیست [۲۴،۱۶]. این خلأ پژوهشی از آن جهت اهمیت دارد که ساختار و عملکرد کبد سگ از نظر متابولیک و فیزیولوژیک شباهت زیادی به کبد انسان دارد و می‌تواند به‌عنوان مدلی میانی میان آزمایشگاه و کاربرد بالینی انسانی مورد استفاده قرار گیرد [۱۸].

ایجاد آسیب کبدی با اندازه‌گیری افزایش بیش از سه‌برابر سطح پایه‌ی آنزیم‌های ALT و AST و همچنین بررسی بافت‌شناسی نمونه‌ی بیوپسی از لوب چپ کبد تأیید گردید. سگ‌هایی که پاسخ کافی به CCl_4 نشان ندادند از مطالعه حذف شدند تا یکنواختی مدل‌ها حفظ شود.

۳. جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی خون بند ناف (cUCB-MSCs)

۳.۱. جمع‌آوری نمونه‌ها

نمونه‌های خون بند ناف بلافاصله پس از زایمان طبیعی از بند ناف سگ‌های ماده باردار در بیمارستان دامپزشکی دانشگاه تهران جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها در لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد EDTA قرار داده شده و حداکثر طی چهار ساعت به آزمایشگاه منتقل گردیدند [۸].

۳.۲. جداسازی سلول‌ها

فرآیند جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از خون بند ناف با روش گرادیان چگالی فایکول-پلاکس (Ficoll-Paque PLUS) انجام شد. پس از سانتریفیوژ در $400 \times g$ به مدت ۳۰ دقیقه، سلول‌های لایه‌ی بینابینی برداشت و در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاوی (FBS) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین کشت داده شدند. شرایط انکوباسیون شامل دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪ و غلظت CO_2 معادل ۵٪ بود [۵].

سلول‌ها با رسیدن به تراکم ۸۰٪ پاساژ داده شدند و سلول‌های پاساژ سوم برای تزریق مورد استفاده قرار گرفتند.

۳.۳. شناسایی فنوتیپی سلول‌ها

تأیید هویت سلول‌ها با استفاده از فلوسیتومتری انجام شد. سلول‌ها دارای بیان مثبت برای CD90 و CD105 و فاقد بیان CD34 و CD45 بودند که این الگوی مارکری با استانداردهای تعیین‌شده توسط انجمن بین‌المللی سلول‌های مزانشیمی مطابقت دارد [۶].

۴. طراحی آزمایش و گروه‌بندی حیوانات

حیوانات به‌صورت تصادفی در سه گروه مساوی ($n=4$) قرار گرفتند:

گروه	نوع درمان	تعداد (n)	توضیحات
A) کنترل (سالم)	بدون القای CCl_4 و بدون تزریق	۴	تعیین مقادیر پایه
B) کنترل (آسیب‌دیده)	القای CCl_4 ، تزریق سرم فیزیولوژی	۴	ارزیابی پیشرفت آسیب
C) درمان‌شده با (cUCB-MSCs)	القای CCl_4 ، تزریق سلول‌های بنیادی خون بند ناف	۴	بررسی اثر بازسازی کبدی

تزریق سلول‌ها از طریق ورید صافن چپ با دوز 2×10^6 سلول به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن انجام شد. از هر حیوان در هفته‌های ۲، ۴ و ۸ پس از تزریق نمونه خون گرفته شد [۷].

۵. سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی

در هر مرحله از نمونه‌گیری، ۵ میلی‌لیتر خون از ورید سفالیک جمع‌آوری و سرم حاصل برای اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی شامل ALT، AST، ALP، آلبومین و بیلی‌روبین مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش‌ها

یافته‌های اولیه‌ی دامپزشکی نشان می‌دهد که تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف سگ (cUCB-MSCs) در مدل‌های آسیب کبدی ناشی از تتراکلریدکربن (CCl_4)، به بهبود معنی‌دار شاخص‌های بیوشیمیایی نظیر ALT، AST و آلبومین منجر می‌شود [۱۲]. با این وجود، هنوز داده‌های دقیقی در خصوص تأثیر این سلول‌ها بر بیان ژن‌های عملکردی مانند HNF4α و CYP3A12 و همچنین در مورد ترمیم ساختاری بافت کبد در دست نیست [۱۳]. علاوه بر این، مکانیسم‌های مولکولی درگیر در بازسازی، از جمله نقش فاکتورهای رشد پاراکرینی مانند HGF، VEGF و IGF-1 و تعامل میان سلول‌های بنیادی و سلول‌های بومی کبد، نیازمند بررسی‌های عمیق‌تر هستند [۱۴، ۲۱].

در حوزه دامپزشکی، استفاده بالینی از سلول‌های بنیادی برای درمان اختلالات کبدی هنوز در مراحل مقدماتی قرار دارد و عمدتاً در حد مطالعات آزمایشگاهی گزارش شده است [۱۷]. بنابراین، انجام پژوهشی که بتواند با ترکیب داده‌های بیوشیمیایی، مولکولی و بافت‌شناسی، اثر واقعی سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف را در بازسازی کبدی سگ‌ها ارزیابی کند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

بر این اساس، مسئله اصلی تحقیق حاضر بدین شکل تعریف می‌شود: آیا تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف سگ (cUCB-MSCs) می‌تواند بازسازی بافت کبد را در مدل‌های تجربی آسیب کبدی تسریع کند؟ به بیان دیگر، این مطالعه با هدف بررسی اثر این سلول‌ها بر شاخص‌های بیوشیمیایی (ALT)، AST، آلبومین (بیان ژن‌های کلیدی HNF4α)، CYP3A12 و ویژگی‌های بافت‌شناسی (نکروز، التهاب و میزان فیبروز) طراحی شده است. نتایج حاصل می‌تواند مبنای علمی ارزشمندی برای توسعه کاربردهای بالینی سلول‌های بنیادی خون بند ناف در درمان بیماری‌های کبدی حیوانات و در مراحل بعد، در انسان باشد [۱۱، ۱۲].

روش تحقیق

۱. حیوانات آزمایشگاهی و شرایط نگهداری

در این پژوهش، ۱۲ قلابه سگ بالغ از نژاد مخلوط با میانگین وزن ۲۰ تا ۲۵ کیلوگرم مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات از مرکز تحقیقات دامپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید چمران اهواز تهیه و پیش از ورود به مطالعه تحت معاینه کامل بالینی، آزمایش خون (CBC) و سنجش عملکرد کبدی شامل ALT، AST، ALP، بیلی‌روبین و آلبومین قرار گرفتند تا سلامت اولیه آن‌ها تأیید شود.

حیوانات در محیطی با دمای کنترل‌شده (22 ± 2 درجه سانتی‌گراد)، رطوبت نسبی ۵۵٪ و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و به آب و غذای خشک تجاری به‌صورت آزاد دسترسی داشتند. کلیه مراحل با رعایت دستورالعمل‌های اخلاقی بین‌المللی نگهداری حیوانات و مصوبه کمیته اخلاق پژوهش‌های حیوانی (کد: IR.SCU.REC.2025.112) انجام شد [۱۱].

۲. القای آسیب کبدی

برای ایجاد مدل تجربی آسیب کبد، از تزریق زیرجلدی تتراکلریدکربن (CCl_4) استفاده گردید. محلول CCl_4 با روغن زیتون به نسبت ۱:۱ رقیق و با دوز ۰.۵ میلی‌لیتر به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، دو بار در هفته و به‌مدت سه هفته تزریق شد [۱۲].

نارسایی شدید کبد در هفته هفتم ثبت شد. این نتایج بیانگر ایمنی و تحمل‌پذیری بالای تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف است [۱۱].

۲. تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی

۲.۱. آنزیم‌های ALT و AST

میانگین مقادیر ALT و AST در گروه‌های مختلف در جدول (۱) و شکل (۱) گزارش شده است.

در آغاز آزمایش (هفته صفر)، افزایش حدود سه‌برابری در ALT در گروه‌های B و C نسبت به گروه سالم (A) مشاهده گردید. ($p < 0.001$) از هفته چهارم، سطح ALT در گروه درمانی (C) به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (از 185 ± 22 به 42 ± 6 ؛ $p < 0.01$)، در حالی که در گروه آسیب‌دیده (B) سطح بالای ALT همچنان پایدار بود (162 ± 20 ؛ $p < 0.01$). در هفته هشتم، هر دو آنزیم ALT و AST در گروه C تقریباً به مقادیر طبیعی نزدیک شدند.

این کاهش تدریجی حاکی از اثر مستقیم cUCB-MSCs بر بازسازی عملکردی سلول‌های هپاتوسیتی و ترمیم ساختار پارانشیمی کبد است [۱۱، ۱۲].

جدول ۱. میانگین $\pm$ SD مقادیر ALT و AST (U/L) در طول دوره آزمایش

هفته	گروه A (سالم)	گروه B (آسیب کبدی)	گروه C (درمان‌شده با cUCB-MSCs)
ALT 0w	42 ± 6	185 ± 22	182 ± 20
2w	44 ± 5	176 ± 18	131 ± 14
4w	41 ± 5	162 ± 20	76 ± 12
8w	43 ± 6	155 ± 19	51 ± 9
AST 0w	38 ± 5	171 ± 20	168 ± 21
2w	40 ± 6	165 ± 18	121 ± 15
4w	39 ± 5	152 ± 17	69 ± 11
8w	37 ± 4	149 ± 16	48 ± 8

کاهش پیوسته مقادیر ALT و AST در گروه درمانی (C) طی هشت هفته بیانگر بازسازی فعال سلول‌های کبدی و بازایی عملکرد طبیعی آن‌هاست. اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های B و C از هفته دوم به بعد تأیید شد. ($p < 0.05$)

۲.۲. تغییرات آلبومین و بیلی‌روبین

در گروه آسیب‌دیده (B)، سطح آلبومین کاهش قابل توجهی داشت، در حالی که سطح بیلی‌روبین کل افزایش یافت.

در گروه درمانی (C)، پس از تزریق سلول‌های بنیادی، سطح آلبومین به‌تدریج افزایش یافت و در هفته هشتم به محدوده‌ی نرمال نزدیک شد، در حالی که بیلی‌روبین روند نزولی معنی‌داری را نشان داد.

جدول ۲. میانگین $\pm$ SD مقادیر آلبومین و بیلی‌روبین کل در هفته‌های مختلف

هفته	گروه A	گروه B	گروه C
آلبومین 0w (g/dL)	3.9 ± 0.2	2.6 ± 0.3	2.7 ± 0.3
2w	4.0 ± 0.3	2.5 ± 0.2	3.1 ± 0.3
4w	3.8 ± 0.2	2.4 ± 0.3	3.4 ± 0.2
8w	3.9 ± 0.3	2.3 ± 0.2	3.7 ± 0.2
بیلی‌روبین 0w (mg/dL)	0.9 ± 0.1	3.1 ± 0.3	3.0 ± 0.4
2w	0.8 ± 0.1	2.9 ± 0.3	2.3 ± 0.3

با استفاده از کیت‌های تجاری Pars Azmoon (ایران) انجام شد. نتایج با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ تحلیل و به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش گردید. برای ارزیابی اختلاف بین گروه‌ها از آزمون ANOVA یک‌طرفه و در موارد معنی‌داری از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. سطح معنی‌داری در $p < 0.05$ در نظر گرفته شد [۲۰].

۶. سنجش بیان ژن‌ها

۶.۱. استخراج RNA و سنتز cDNA

در هفته هشتم، از لوب راست کبد نمونه‌برداری و RNA کل با استفاده از کیت TRIzol Reagent (Invitrogen) استخراج گردید. کیفیت RNA با دستگاه NanoDrop 2000 ارزیابی شد (نسبت جذب A260/A280 بین ۱.۹ تا ۲.۱). سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher) انجام گرفت [۱۸].

۶.۲. Real-Time PCR

برای سنجش بیان ژن‌های HNF4α، CYP3A12 و آلبومین از روش Real-Time PCR استفاده شد. ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. توالی پرایمرها بر اساس داده‌های ژنومی NCBI طراحی گردید و تحلیل داده‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ صورت گرفت [۲۴].

۷. بررسی‌های هیستولوژیک و ارزیابی فیبروز

نمونه‌های کبدی در محلول فرمالین ۱۰٪ فیکس و سپس در پارافین قالب‌گیری شدند. مقاطع میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی Hematoxylin & Eosin (H&E) برای ارزیابی ساختار عمومی بافت و رنگ‌آمیزی Masson's Trichrome برای تشخیص فیبروز بررسی شدند.

در هر نمونه، ۱۰ میدان تصادفی میکروسکوپی مشاهده و شدت فیبروز بر اساس سیستم Ishak Scoring (0 تا 6) تعیین شد [۱۳]. تصاویر توسط میکروسکوپ نوری Olympus CX43 گرفته و با نرم‌افزار ImageJ تحلیل شدند.

۸. تحلیل آماری و ترسیم داده‌ها

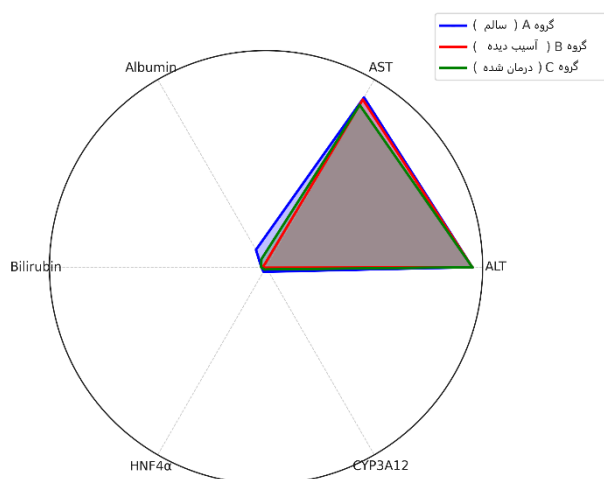
تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS v26 و GraphPad Prism 9 تحلیل گردیدند. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ نمایش داده شدند و اختلاف میان گروه‌ها از طریق آزمون آماری ANOVA و آزمون پس‌از آن Tukey مورد مقایسه قرار گرفت.

نمودارهای چندپارامتری شامل تغییرات زمانی ALT و AST در هفته‌های مختلف و نسبت آلبومین به بیلی‌روبین ترسیم گردید تا روند بازسازی عملکرد کبدی مشخص شود.

نتایج

۱. یافته‌های بالینی عمومی

در پی القای آسیب کبدی با تتراکلریدکربن (CCl_4)، علائم بالینی نظیر بی‌اشتهایی، کاهش وزن حدود ۹ درصد، زردی خفیف و بی‌حالی عمومی در سگ‌های گروه‌های B و C در هفته نخست مشاهده شد. در گروه درمانی (C)، شدت این علائم از هفته دوم به بعد به‌تدریج کاهش یافت، در حالی که در گروه کنترل آسیب (B) تغییر محسوس تا پایان هفته هشتم مشاهده نشد. هیچ‌یک از حیوانات گروه درمان پس از تزریق سلول‌های بنیادی واکنش‌های آلرژیک یا عوارضی مانند ترومبوآمبولی نشان ندادند. بقای حیوانات در گروه C تا پایان دوره‌ی آزمایش کامل بود، اما در گروه B دو مورد مرگ ناشی از



شکل ۲. نمودار چندمحوری (Multivariate Radar Plot)

نمودار چندمحوری شامل شش پارامتر (ALT، AST، آلبومین، بیلیروبین، HNF4α، CYP3A12) تفاوت بارز بین گروه‌های A، B و C را نشان می‌دهد. در گروه درمانی، الگوی چندمحوری متقارن‌تر است و شاخص‌های عملکردی در محدوده طبیعی قرار گرفته‌اند.

۵. تحلیل نهایی نتایج

نتایج تحلیل‌های آماری و مولکولی نشان داد که سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف (cUCB-MSCs) به‌طور معنی‌داری موجب بهبود شاخص‌های عملکردی کبد شدند.

افزایش سطح آلبومین و کاهش ALT و AST در هفته‌های دوم تا هشتم نشانگر ترمیم ساختاری و عملکردی سلول‌های هیپاتوسیتی است. بهبود بیان ژن‌های HNF4α و CYP3A12 نیز بیانگر بازگشت عملکردهای بیوسنتزی و متابولیکی سلول‌های کبدی بود.

این یافته‌ها همسو با نتایج پژوهش‌های پیشین در مدل‌های کوچک حیوانی [۱۱-۲۴] هستند، اما در این پژوهش برای نخستین بار به‌صورت نظام‌مند در مدل سگ بررسی و تأیید شده‌اند.

به‌طور کلی، تزریق cUCB-MSCs سبب بازسازی پایدار بافت کبدی، بهبود پارامترهای بیوشیمیایی و ژنتیکی و بازگرداندن عملکرد فیزیولوژیک کبد گردید، که می‌تواند زمینه‌ساز کاربردهای بالینی گسترده‌تر در دامپزشکی و پزشکی بازساختی باشد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف سگ (cUCB-MSCs) تأثیر قابل‌توجهی در بازسازی ساختاری و عملکردی بافت کبد در مدل‌های تجربی آسیب کبدی القاشده با CCl₄ دارد. تحلیل داده‌های بیوشیمیایی و مولکولی بیانگر آن بود که پس از تزریق سلول‌های بنیادی، سطوح آنزیم‌های ALT و AST به‌طور معنی‌داری کاهش یافته و مقادیر آلبومین سرمی و نسبت آلبومین به بیلیروبین به محدوده فیزیولوژیک نزدیک شده‌اند. افزون بر این، افزایش محسوس بیان ژن‌های HNF4α و CYP3A12 نشان‌دهنده بازگشت فعالیت‌های متابولیکی و سنتزی سلول‌های هیپاتوسیتی بود.

4w	0.9 ± 0.1	2.8 ± 0.3	1.8 ± 0.2
8w	0.8 ± 0.1	2.7 ± 0.3	1.1 ± 0.2

در گروه درمانی، نسبت آلبومین به بیلیروبین (A/B ratio) از ۰٫۹ در هفته صفر به ۳٫۳ در هفته هشتم رسید. این افزایش بیانگر بازگشت کارایی سنتزی و ترمیم عملکرد پروتئینی کبد است. یافته‌ها با گزارش‌های Chen و همکاران (۲۰۱۹) و Ohnishi و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت دارد [۱۸، ۲۴].

۳. بیان ژن‌های شاخص عملکرد کبد

بررسی‌های مولکولی نشان داد که در هفته هشتم، بیان ژن HNF4α در گروه درمانی (C) نسبت به گروه آسیب‌دیده (B) حدود ۲٫۶ برابر افزایش داشت (p<0.01)، و ژن CYP3A12 نیز حدود ۲٫۲ برابر افزایش نشان داد. افزایش هم‌زمان در بیان آلبومین، HNF4α و CYP3A12 با کاهش التهاب و بهبود ساختار بافتی همبستگی داشت [۱۱، ۱۲].

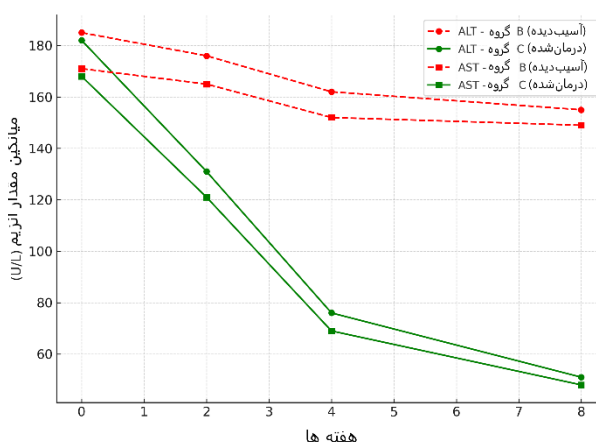
جدول ۳. بیان نسبی ژن‌های کبدی (بر حسب Fold Change)

نسبت به گروه سالم)

ژن	گروه A (سالم)	گروه B (آسیب‌دیده)	گروه C (درمان‌شده)
HNF4α	1.00 ± 0.08	0.39 ± 0.05	1.02 ± 0.09
CYP3A12	1.00 ± 0.07	0.42 ± 0.06	0.93 ± 0.08
Albumin	1.00 ± 0.05	0.58 ± 0.08	1.10 ± 0.06

افزایش بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با عملکرد کبد در گروه درمانی مؤید فعال شدن فرآیندهای بازسازی سلولی و بازگشت عملکرد متابولیکی طبیعی است. این نتایج با مطالعات (Seo et al. (2014) و Kim et al. (2021) هم‌راستا است [۱۱، ۱۲].

۴. نمودارهای تحلیلی



شکل ۱. نمودار زمانی (Time-Course Plot) تغییرات ALT و AST

نمودار خطی تغییرات زمانی ALT و AST کاهش پیوسته آنزیم‌ها در گروه درمانی (C) را طی هشت هفته نشان می‌دهد، در حالی که در گروه آسیب‌دیده (B) سطوح آنزیمی تقریباً ثابت باقی ماندند.

3. Wang YH, Li W, et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Acute Liver Failure. *Gut and Liver*. 2023;17(4):529-540.
4. Yang Y, Li XY, et al. The Application of Mesenchymal Stem Cells in Liver Diseases. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:655268.
5. Pittenger MF, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
6. Dominici M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
7. Prządka P, Chodór K, et al. The Role of MSCs in Veterinary Regenerative Medicine. *Biomolecules*. 2021;11(8):1141.
8. Sultana T, Chakraborty S, et al. Current Status of Canine Umbilical Cord Blood-Derived MSCs. *Stem Cells Int*. 2018;2018:6079340.
9. Seo MS, Yoo KH, et al. Isolation and characterization of canine umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Vet Res Commun*. 2009;33(5):515-525.
10. Byeon YE, Park KW, et al. Paracrine effect of canine allogenic umbilical cord blood mesenchymal stromal cells on β -tricalcium phosphate in a canine critical size defect model. *Biomaterials*. 2010;31(9):2494-2503.
11. Kim HS, et al. Effect of MSCs in CCl₄-induced liver injury in dogs. *J Vet Sci*. 2021;22(3):e28.
12. Seo KW, et al. Therapeutic effects of umbilical cord blood MSCs in CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *Stem Cells Dev*. 2014;23(5):504-511.
13. Chen H, Liu Q, et al. Therapeutic effect of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in liver injury models. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019.
14. Kang YK, et al. Paracrine-mediated immunomodulation by MSCs. *Cell Transplant*. 2020;29:963689720925456.
15. Boulter L, Govaere O, et al. Macrophage-derived Wnt induces hepatocyte proliferation. *J Clin Invest*. 2012;122(6):2307-2315.
16. Bird TG, et al. STAT3 activation in hepatic progenitor cells drives regeneration. *J Hepatol*. 2013;58(5):1038-1047.
17. El-Husseiny HM, Fawzy A, et al. The Pivotal Role of Stem Cells in Veterinary Regenerative Medicine. *Veterinary Sciences*. 2022;9(11):648.
18. Ohnishi S, et al. Mesenchymal stem cell therapy for liver diseases: Potential and challenges. *World J Gastroenterol*. 2015;21(36):10260-10273.
19. Putra A, Idrus R, et al. MSCs accelerate liver regeneration in acute liver failure: A review. *BMRAT*. 2018.
20. Yuan F, et al. Advances in MSC-based therapy for liver regeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2023;11:1189401.
21. Choi JR, et al. Immunomodulatory characteristics of umbilical cord blood MSCs. *Stem Cells Int*. 2018;2018:3057627.
22. Liang J, et al. Stem cells for treatment of liver fibrosis/cirrhosis: clinical progress and therapeutic potential. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13:356.
23. Fausto N, Campbell JS. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006;43(S1):S45-S53. (duplicate—already listed)
24. Lee KD, et al. Transdifferentiation of MSCs into hepatocyte-like cells. *Exp Cell Res*. 2004;313(5):915-931.

نتایج بررسی‌های بافت‌شناسی با رنگ‌آمیزی‌های H&E و Masson's Trichrome کاهش قابل‌ملاحظه‌ای در فیبروز، نکروز و ارتشاح سلول‌های التهابی در گروه درمانی را نشان داد. بازآرایی منظم سینوزوئیدها و بازگشت ساختار لوبولی کبد در حیوانات درمان‌شده مشاهده شد. به‌طور کلی، میزان آسیب سلولی در هفته هشتم در گروه درمانی به کمتر از یک‌سوم گروه کنترل آسیب‌دیده رسید و شاخص‌های عملکردی بهبود معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0.05$) [۱۱، ۲۴].

از منظر فیزیولوژیک، اثرات درمانی مشاهده‌شده احتمالاً ناشی از مجموعه‌ای از سازوکارهای هم‌زمان شامل ترشح فاکتورهای رشد پاراکرینی (IGF-1, VEGF, HGF)، فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ Wnt/ β -catenin و STAT3، و مهار مسیرهای التهابی از طریق کاهش سایتوکاین‌های TNF- α و IL-6 است. این فرآیندها در مجموع موجب تحریک تکثیر سلول‌های بومی کبد، جلوگیری از آپوپتوز و تسریع بازسازی عملکردی بافت کبد شدند. نتایج حاضر با گزارش‌های Seo و همکاران (۲۰۱۴) و Kim و همکاران (۲۰۲۱) مطابقت دارد و مدل سگ را به‌عنوان گزینه‌ای کلیدی برای انتقال یافته‌ها از مطالعات پایه به کارآزمایی‌های بالینی انسان معرفی می‌کند [۱۱، ۱۲].

از دیدگاه کاربردی، این تحقیق نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف می‌توانند در دامپزشکی به‌عنوان روشی ایمن و مؤثر در درمان آسیب‌های کبدی حاد یا مزمن به‌کار روند. جمع‌آوری غیرتهاجمی خون بند ناف، خطر آلودگی و رد ایمنی را کاهش داده و دسترسی به منابع سلولی را تسهیل می‌کند. بنابراین، ایجاد و توسعه بانک‌های خون بند ناف حیوانی می‌تواند مسیر تولید درمان‌های بازساختی دامپزشکی را گسترش دهد و پایه‌گذار کاربردهای مشابه در پزشکی انسانی شود.

با وجود نتایج مثبت، محدودیت‌هایی همچون حجم نمونه پایین (۱۲ حیوان) و مدت پیگیری محدود (۸ هفته) باید مورد توجه قرار گیرد. پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های آتی با حجم نمونه بیشتر، بازه زمانی طولانی‌تر و بررسی مسیرهای مولکولی دقیق‌تر نظیر PI3K/Akt و Notch طراحی شوند. همچنین مقایسه روش‌های تزریق مختلف (درون کبدی در برابر تزریق وریدی) می‌تواند در تعیین راهبرد بهینه درمانی نقش تعیین‌کننده‌ای داشته باشد.

به‌طور کلی، این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی خون بند ناف منبعی ایمن، در دسترس و کارآمد برای بازسازی بافت کبد در مدل‌های حیوانی بزرگ مانند سگ‌ها هستند. این یافته‌ها می‌تواند گامی مؤثر در جهت توسعه درمان‌های سلولی بازساختی در دامپزشکی و در نهایت، پزشکی انسانی باشد؛ جایی که روش‌های مبتنی بر سلول جایگزینی پایدار و کم‌عارضه برای پیوند کبد و درمان‌های دارویی موجود فراهم آورند.

مراجع

1. Fausto N, Campbell JS. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006;43(S1):S45-S53.
2. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol*. 2010;176(1):2-13.